

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
24 juillet 2003 (24.07.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/060493 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :

G01N 21/64, A61B 1/04, G02B 23/26, A61B 5/00

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :

MAUNA KEA TECHNOLOGIES [FR/FR]; 9, rue
d'Enghien, F-75010 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR02/04480

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : GENET,
Magalie [FR/FR]; 74, cours de Vincennes, F-75012
Paris (FR). BOURG-HECKLY, Geneviève [FR/FR]; 5,
rue Elzévir, F-75003 Paris (FR). VILETTE, Sandrine
[FR/FR]; 28, rue des Terres au Cure, F-75013 Paris (FR).
LACOMBE, François [FR/FR]; 2173, avenue Roger
Salengro, F-92370 Chaville (FR). LOISEAU, Alexandre
[FR/FR]; 1, rue du Gros Caillou, F-75007 Paris (FR).
ABRAT, Benjamin [FR/FR]; 18, rue Pierre Guérin,
F-75016 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international :

20 décembre 2002 (20.12.2002)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

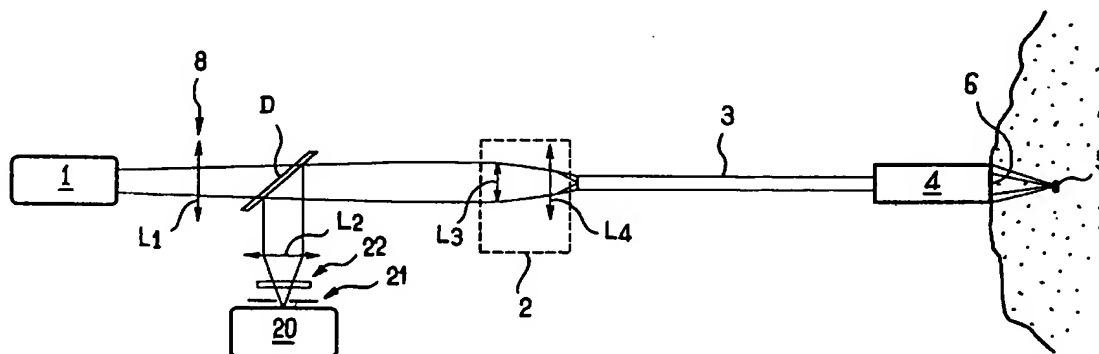
(30) Données relatives à la priorité :

01/16981 28 décembre 2001 (28.12.2001) FR

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: EQUIPMENT FOR SPECTROSCOPY OF SUBSURFACE AUTOFLUORESCENCE

(54) Titre : APPAREILLAGE DE SPECTROSCOPIE D'AUTOFLUORESCENCE SUBSURFACIQUE



(57) Abstract: The invention concerns an equipment comprising an excitation source (1), means for injecting (2) an excitation signal produced by said source in an ordered bundle (3) of flexible optical fibers, means for analyzing (21, 22) an emitted autofluorescence signal. The invention is characterized in that it comprises in output of the optical fiber bundle (3) an optical head (4) designed to be placed in contact with the biological tissue (6), said optical head being equipped with optical means adapted to cause the excitation signal output from said bundle (3) to converge into a subsurface analyzing zone (5), the same optical fiber(s) used for excitation of said bundle (3) being used for detecting the signal emitted by said subsurface analyzing zone, means (D) placed upstream of the injection means (2) being further provided to separate the wavelength of the excitation signal and the wavelength of the autofluorescence signal.

(57) Abrégé : Il comprend une source d'excitation (1), un moyen d'injection (2) d'un signal d'excitation produit par ladite source dans un faisceau ordonné (3) de fibres optiques souples, un moyen d'analyse (21, 22) d'un signal d'autofluorescence émis. Il est caractérisé en ce qu'il comporte en sortie du faisceau (3) de fibres optiques une tête optique (4) destinée à être placée au contact du tissu biologique (6), ladite tête optique étant munie de moyens optiques adaptés à faire converger le signal d'excitation sortant dudit faisceau (3) en une zone d'analyse subsurfacique (5), la ou les mêmes fibres optiques ayant servi à l'excitation dudit faisceau (3) étant utilisées pour détecter le signal émis par ladite zone d'analyse subsurfacique, des moyens (D) placés en amont du moyen d'injection (2) étant en outre prévus pour séparer la longueur d'onde du

[Suite sur la page suivante]

WO 03/060493 A1



(74) Mandataires : DE SAINT VIANCE, Isabelle etc.; Pontet Allano & Associes Selarl, 25, rue Jean Rostand, Parc Club Orsay Université, F-91893 Orsay Cedex (FR).

européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

«Appareillage de spectroscopie d'autofluorescence subsurfacique»

La présente invention concerne un appareillage de spectroscopie d'autofluorescence subsurfacique. Plus particulièrement, l'appareillage selon
5 l'invention est du type utilisant un signal d'excitation véhiculé par une ou plusieurs fibres optiques souples.

Les domaines d'application de l'invention sont l'analyse spectroscopique de tissus biologiques in vivo sur l'homme ou l'animal, externes ou internes et accessibles à l'aide d'un canal opérateur
10 d'endoscope dans lequel on peut introduire les fibres optiques, et également l'analyse ex-vivo d'échantillons tissulaires provenant de prélèvements biopsiques, et l'analyse in-vitro de cultures en biologie cellulaire.

Actuellement sont visés les domaines médicaux de la gastro-entérologie, la pneumologie, la gynécologie, l'urologie, l'ORL, la
15 dermatologie, l'ophtalmologie, la cardiologie et de la neurologie.

Les tissus biologiques contiennent des fluorophores endogènes susceptibles, en réponse à une excitation lumineuse de longueur d'onde appropriée, d'émettre une fluorescence dans un domaine spectral allant de
20 l'UV proche au visible, appelée autofluorescence. Cette dernière résulte du recouvrement d'émissions de différents fluorophores, et dépend du métabolisme cellulaire, de la structure et de la vascularisation des tissus, qui varient suivant la nature saine ou tumorale des tissus. Il en résulte que la fluorescence des tissus sains et tumoraux présentent de fortes différences tant sur le plan de l'intensité émise que sur la forme du spectre.
25 L'analyse du spectre d'autofluorescence fournit des indicateurs permettant une "biopsie optique".

Dans les appareillages existants, l'illumination du site que l'on souhaite analyser de manière spectroscopique se fait couramment avec un faisceau d'excitation de fibres optiques qui est divergent, excitant un
30 volume, et la réception du signal de fluorescence s'effectue au moyen de fibres de détection adjacentes notamment périphériques. Cela entraîne une

mauvaise résolution, avec un mélange d'informations et une augmentation du nombre de faux positifs.

La présente invention a pour but de pallier ces inconvénients.

Il a été par ailleurs proposé des techniques d'imagerie confocale à
5 haute résolution spatiale destinées à observer un plan de coupe XY à différentes profondeurs du site observé, notamment exposée dans la demande de brevet WO 00/16151.

Ces techniques mettent en œuvre un faisceau ordonné de fibres optiques souples (notamment plusieurs dizaines de milliers) avec, côté
10 observateur, une source lumineuse et un système d'injection de fibres permettant d'illuminer une seule fibre et, côté site observé, une tête optique permettant de focaliser le faisceau sortant de la fibre illuminée en un point situé dans un plan de coupe XY, à une profondeur donnée du site observé. Un système de balayage de fibres permet de balayer les fibres une à une à
15 très grande vitesse. Chaque fibre est utilisée tour à tour pour véhiculer le faisceau d'illumination et également le faisceau de retour correspondant provenant du site observé. L'obtention d'une haute résolution spatiale est due au fait que l'on focalise le faisceau en un point et également au caractère confocal résidant dans le filtrage spatial du site observé par les
20 mêmes fibres que celles ayant servi à l'illumination. Cela permet de réceptionner exclusivement le signal provenant du site observé et de réaliser une image point par point.

La présente invention a pour but de proposer un appareillage qui permette une analyse spectroscopique également à haute résolution spatiale
25 et à une profondeur donnée du site observé.

Elle propose un appareillage d'analyse spectroscopique d'autofluorescence d'un tissu biologique comprenant une source d'excitation, un faisceau constitué d'une fibre optique unique ou d'une pluralité de fibres optiques souples et un moyen d'injection d'un signal
30 d'excitation produit par ladite source dans ledit faisceau selon un diamètre utile correspondant à l'excitation de la fibre unique, de toutes les fibres

optiques du faisceau ou d'un sous-groupe déterminé, et un moyen d'analyse d'un signal d'autofluorescence émis, caractérisé en ce qu'il comporte en sortie dudit faisceau de fibres optiques souples une tête optique destinée à être placée au contact du tissu biologique, ladite tête optique étant munie

5 de moyens optiques adaptés à faire converger le signal d'excitation sortant dudit faisceau de fibres optiques souples en une zone d'analyse subsurfacique, la ou les mêmes fibres optiques dudit faisceau ayant servi à l'excitation étant utilisées pour détecter le signal émis par ladite zone d'analyse subsurfacique, des moyens placés en amont du moyen d'injection

10 étant en outre prévus pour séparer la longueur d'onde du signal d'excitation et la longueur d'onde du signal d'autofluorescence émis.

La présente invention est ainsi basée sur certains des moyens cités plus haut pour réaliser une image confocale, à savoir véhiculer sur la ou les mêmes fibres le signal d'excitation et en retour le signal émis, et la mise en

15 œuvre d'une tête optique focalisant le signal d'excitation en un point en profondeur. La focalisation combinée au caractère confocal (obtenu grâce au retour du signal d'autofluorescence par la ou les mêmes fibres optiques), permet d'obtenir une haute résolution spatiale. L'avantage par rapport à une spectroscopie grand champ est que l'on peut réaliser une sélection spatiale

20 très précise de la zone d'analyse et que l'on réduit ainsi beaucoup les risques d'erreurs et de faux positifs.

Les moyens optiques de la tête optique comprennent un système de lentilles formant un objectif de focalisation adapté à transcrire la répartition spatiale de la tache focale en sortie du faisceau de fibres et la qualité du

25 front d'onde et à minimiser la réflexion parasite s'opérant en sortie du faisceau de fibres.

Selon la présente invention, le nombre de fibres optiques du faisceau peut varier entre une fibre unique et une pluralité de fibres (notamment plusieurs dizaines de milliers) pouvant être toutes excitées ou par sous-

30 ensembles sélectionnés selon les dimensions de la zone d'excitation que l'on recherche.

La zone d'excitation selon l'invention se situe dans un plan XY perpendiculaire à l'axe optique que l'on peut régler à différentes profondeurs, allant sensiblement de 50 à 400 μm . Sa dimension dépend du diamètre de l'ensemble de fibres utilisé (appelé ci-après le diamètre utile du faisceau de fibres), et des caractéristiques optiques de focalisation de la tête optique. Lorsque l'on utilise un faisceau constitué d'une multitude de fibres optiques souples, l'appareillage peut avantageusement comprendre des moyens permettant de régler le diamètre du faisceau d'excitation émis par la source pour qu'il excite en continu soit l'ensemble des fibres soit un sous-groupe de fibres permettant d'obtenir une taille appropriée pour la zone d'excitation. Ces moyens sont par exemple constitués d'une lentille d'adaptation de faisceau ou d'un système afocal de grandissement approprié.

La présente invention propose également un appareillage comportant en outre des moyens permettant d'obtenir conjointement une image confocale du site d'analyse. Une telle possibilité de couplage permet d'augmenter avantageusement le degré de certitude d'un diagnostic. Grâce à l'invention, on pourra obtenir simultanément et en temps réel, sur un point focalisé en profondeur, des informations :

- de type histologique par imagerie confocale ; et
- de type spectroscopique renseignant sur la nature du site observé.

Elle propose un appareillage tel que défini ci-dessus, le faisceau de fibres comportant une pluralité de fibres optiques, caractérisé en ce qu'il comporte en outre des moyens pour réaliser conjointement une image confocale de la zone d'analyse, comprenant :

- une source d'illumination,
- un détecteur du signal de retour pour analyse,
- un moyen de séparation du signal d'illumination et dudit signal de retour,
- des moyens pour coupler le signal d'excitation pour l'analyse spectroscopique et le signal d'illumination pour l'imagerie

confocale, avant l'entrée dans le moyen d'injection dans le faisceau de fibres optiques,

- un moyen de balayage rapide des fibres une à une situé en amont du moyen d'injection dans le faisceau de fibres, et
- 5 - un système de filtrage spatial à l'entrée du détecteur de signal adapté à sélectionner le signal de retour provenant de la fibre illuminée,

le moyen d'injection dans le faisceau de fibres présentant une répartition spatiale de l'intensité de la tache focale égale au diamètre de
10 cœur d'une fibre, chaque fibre étant illuminée tour à tour et de manière adressée.

Selon l'invention, la voie tomographique et la voie spectroscopique utilisent avantageusement en commun le moyen d'injection dans le faisceau de fibres, le faisceau de fibres lui-même et la tête optique de focalisation.
15 Pour l'acquisition d'une image, les fibres sont illuminées tour à tour et une à une. Pour l'acquisition d'un spectre d'autofluorescence, les fibres peuvent être excitées toutes ou par sous-groupes, en fonction des dimensions de la zone d'analyse.

L'utilisation d'un faisceau de fibres optiques souples peut être
20 avantageuse pour un système de tests automatiques dans lequel avantageusement le faisceau de fibres, avec à son extrémité la tête optique, est manipulé de manière automatisée comme un bras de mesure sur une matrice d'échantillons.

La présente invention sera mieux comprise et d'autres avantages
25 apparaîtront à la lumière de la description qui va suivre de deux exemples de réalisation, description faite en référence aux dessins sur lesquels :

- la figure 1 illustre schématiquement un premier exemple de réalisation d'appareillage de spectroscopie selon l'invention ;
- la figure 2 illustre schématiquement un deuxième exemple de
30 réalisation d'appareillage comprenant un couplage analyse spectroscopique et imagerie confocale ; et

- la figure 3 illustre schématiquement une variante de réalisation de l'appareillage de la figure 2.

Selon l'exemple de réalisation choisi et représenté sur la figure 1, il est proposé un appareillage pour réaliser une analyse spectroscopique subsurfacique à une profondeur donnée, comportant une source 1 produisant un signal d'excitation, un moyen d'injection 2 dudit signal dans un faisceau 3 ordonné de fibres optiques au bout duquel est ménagé une tête optique 4 adaptée à modifier le signal d'excitation sortant dudit faisceau de fibres optiques 3 pour créer un faisceau convergent focalisé sur une zone 5 sous-jacente de la zone de contact 6 avec la tête optique 4.

La source 1 utilisée est choisie pour permettre une excitation des fluorophores endogènes présents dans les tissus biologiques du site observé, notamment dans une plage de longueur d'onde de 300-500 nm. Typiquement on peut utiliser une diode laser à 405 +/- 10 nm. D'autres sources telles que les lasers solides ou lasers à gaz avec ou non générateurs d'harmoniques peuvent également convenir avec d'autres longueurs d'ondes afin d'exciter d'autres fluorophores endogènes.

L'appareillage comporte un moyen d'adaptation 8 de faisceau émis par la source 1 comprenant ici une lentille L1 qui est correctement couplée au moyen d'injection 2 dans le faisceau 3 de fibres optiques. La combinaison optique permet d'adapter la taille du faisceau laser au diamètre utile dudit faisceau de fibres optiques 3, correspondant à l'ensemble ou à un sous-ensemble de fibres effectivement utilisées. Elle permet en outre ici d'agrandir le diamètre de la tache de focalisation à l'entrée du faisceau 3 de fibres et par conséquent d'agrandir la taille de la tache formée sur le tissu. Cela permet de réduire l'irradiance (c'est à dire la quantité de puissance par unité de surface) sur le tissu, et ainsi de respecter les normes d'éclairement des tissus biologiques.

L'appareillage comporte également un moyen adapté à séparer deux longueurs d'onde, la longueur d'onde d'excitation et le signal d'autofluorescence émis. Une lame dichroïque D est utilisée ici à cet effet

réalisant une transmission maximale à la longueur d'onde d'illumination et une réflexion maximale dans le domaine spectral de fluorescence.

Le signal à la longueur d'onde d'excitation est dirigé en sortie de la lame D vers le moyen optique d'injection 2 dans le faisceau de fibres 3. Ce
5 moyen doit présenter le minimum d'aberrations et ne doit pas dégrader la qualité du front d'onde afin de réaliser une tache de focalisation proche de la limite de diffraction pour ainsi réaliser un couplage optimal avec le faisceau de fibres 3. Le moyen choisi ici est constitué d'un doublet sur mesure L3 et d'un triplet standard L4. Le doublet L3 permet de corriger les
10 aberrations résiduelles du triplet L4, à savoir la courbure de champ. Toute autre combinaison optique présentant une qualité de front d'onde WFE ("Wave Front Error") de l'ordre de $\lambda/8$ et une répartition spatiale de l'intensité de la tache focale PSF ("Point Spread Function") égale au diamètre utile du faisceau de fibres 3 peut convenir.

15 Le faisceau de fibres 3 permet d'accéder à la zone d'analyse en déportant la source 1. Pour une application endoscopique, il doit présenter un diamètre et un rayon de courbure permettant une insertion aisée dans le canal opérateur de l'endoscope, qui est de quelques millimètres de diamètre suivant l'application clinique (entre 2 mm et 4 mm). On peut utiliser un
20 faisceau constitué d'une fibre optique souple unique ou bien d'une pluralité de fibres. En pratique, le diamètre utile peut être choisi en fonction de la tache de focalisation de la tête optique, par exemple pour qu'elle soit de l'ordre de plusieurs centaines de microns dans lesquels on sait que la nature du tissu biologique observé ne diffère pas d'une cellule à une autre.

25 En sortie du faisceau de fibres 3, le signal d'excitation traverse la tête optique 4. Celle-ci comprend plusieurs moyens optiques, permettant de faire converger le signal d'excitation, et deux lames de verre (non représentés sur les figures), l'une en commun avec la sortie du faisceau de fibres 3 et l'autre en contact avec le tissu afin de réaliser une adaptation d'indice avec
30 les tissus biologiques.

Les moyens optiques présentent les caractéristiques suivantes :

- permettre une analyse du tissu à une profondeur de plusieurs dizaines à plusieurs centaines de microns ;
- minimisation des aberrations afin de transcrire la PSF en sortie du faisceau de fibres sur le tissu sans élargir celle-ci ou la déformer ;
- 5 - optimisation du taux de couplage en retour dans le faisceau de fibres en optimisant la qualité du front d'onde ;
- minimisation de la réflexion parasite s'opérant en sortie du faisceau de fibres par l'intégration d'une lame de verre.

De plus, s'il s'agit d'une tête optique destinée à un endoscope, ses
10 dimensions doivent être compatibles avec celle du canal opérateur de l'endoscope.

Le bloc optique de focalisation est constitué d'un système de lentilles à grandissement unitaire ou non,, formant un objectif sur-mesure ou un système comprenant par exemple deux objectifs de microscopes.

15 Selon l'invention, la ou les fibres du faisceau 3 ont pour fonction également de détecter le signal émis par la zone 5 subsurfacique. En sortie du faisceau de fibres 3, le signal détecté est, comme on l'a vu réfléchi par la lame dichroïque D et dirigé vers la fente 21 d'un spectrographe 20. Le couplage du signal de fluorescence à la fente 21 du spectrographe est
20 réalisé grâce à un doublet achromatique. En variante, on peut utiliser toute autre optique achromatique, l'analyse du signal de fluorescence s'effectuant sur un large domaine spectral (350nm-650nm). Un filtre passe-haut 22 permet ainsi de supprimer la longueur d'onde d'excitation (la lumière rétrodiffusée par le tissu à la même longueur d'onde que la longueur d'onde
25 d'excitation est en effet beaucoup plus importante que la lumière d'autofluorescence des tissus qui se produit à des longueurs d'onde plus grandes). Par conséquent, afin de ne pas saturer le détecteur, on bloque la lumière rétrodiffusée par le filtre passe-haut et une lentille L2, placée en amont du filtre passe-haut 22, permet d'améliorer le rapport signal à bruit
30 en augmentant le signal détecté par l'adaptation du faisceau de retour aux dimensions de la fente 21.

Le spectrographe 20 est choisi de manière à présenter une grande ouverture numérique, un refroidissement par effet Peltier, un faible bruit afin d'augmenter le rapport signal à bruit, ainsi qu'une bonne résolution spectrale (de l'ordre de 3 nm). Des moyens de visualisation de spectre et d'analyse et de traitement sont en outre prévus.

A la figure 2, est représenté schématiquement l'appareillage de la figure 1 auquel on a couplé avantageusement un système d'imagerie confocale. L'appareillage comprend donc une voie spectroscopique qui correspond à celle décrite en référence à la figure 1 (les mêmes références sont utilisées) et une voie supplémentaire tomographique permettant de réaliser conjointement une image confocale du site d'analyse. Les deux voies utilisent avantageusement en commun le faisceau de fibres optiques 3 et la tête optique 4, ainsi que le moyen d'injection 2 dans ledit faisceau de fibres 3.

De manière spécifique, pour obtenir une image confocale point par point, l'appareillage utilise ici un faisceau 3 comprenant plusieurs fibres optiques qui sont illuminées une à une et tour à tour de manière adressée. On peut utiliser tout faisceau présentant suffisamment de fibres et un faible espacement inter-cœur afin d'obtenir une bonne résolution spatiale. A titre d'exemple, on peut utiliser un toron de fibres optiques de marque Sumitomo® constitué de 30 000 fibres de diamètre de cœur de $2,5 \mu\text{m}$ et d'espacement inter-cœur de $4 \mu\text{m}$, ou bien un toron de marque Fujikura® constitué de 30 000 fibres de diamètre de cœur de $2 \mu\text{m}$ et d'espacement inter-cœur de $3,7 \mu\text{m}$. De tels faisceaux de fibres sont compatibles avec une application endoscopique. Pour la voie spectroscopique, l'acquisition du spectre avec de tels faisceaux de fibres se fera sur la totalité des fibres du faisceau qui correspond à une zone d'analyse de plusieurs centaines de microns dans laquelle la nature du tissu ne diffère pas d'une cellule à une autre.

Egalement de manière spécifique, la tête optique est adaptée à une imagerie confocale fibre à fibre permettant d'obtenir une zone d'analyse

focalisée de l'ordre de 0,5 mm de diamètre dans un plan d'analyse en coupe XY.

En amont du faisceau de fibres 3, la voie tomographique comporte une source 30 constituée d'une diode laser à 683 nm et présentant une très
5 bonne qualité de front d'onde. Cette diode est pulsée afin de dissocier par détection synchrone le signal utile de la réflexion parasite qui s'opère à l'entrée du faisceau de fibres 3. On pourrait aussi utiliser un laser solide ou à gaz, mais le choix en longueur d'onde dans la bande 600-800 nm où l'absorption dans les tissus est moindre, est moins étendu ; de plus, le coût
10 à puissance équivalente est bien plus important.

Pour séparer le signal d'illumination et le signal retour d'analyse, on utilise un moyen de séparation constitué ici d'un cube séparateur 31 50/50 pour des commodités de réglage. On peut aussi utiliser une lame séparatrice 50/50.

15 L'appareillage comporte un système de balayage 32 dont le but est de reproduire une matrice de diodes de même qualité optique que la diode laser de la source et que l'on injectera fibre à fibre. Ceci nécessite une combinaison de moyens optiques non standards permettant de corriger les aberrations présentes dans le système de transport et de duplication de
20 source afin d'éclairer le faisceau 3 fibre par fibre. Cette technique d'imagerie point à point (chaque point correspondant à l'illumination d'une fibre) permet d'obtenir une image confocale de très bonne qualité et à une cadence d'image appropriée (15 images/s).

Le système de balayage est constitué de deux miroirs M1 et M2, l'un
25 est un miroir résonant à une fréquence de 4 kHz ou 8 kHz, l'autre un miroir galvanométrique avec une fréquence variable entre 0 et 300 Hz, et de deux systèmes optiques chacun constitué de quatre lentilles, respectivement L5, L6, L7 et L8, et L9, L10, L11 et 12 permettant de conjuguer les deux miroirs dans un premier temps, puis le miroir M2 et l'entrée du faisceau de
30 fibres 3. Ces systèmes optiques ne doivent pas présenter d'aberrations qui pourraient :

- élargir la PSF après le système d'injection et ainsi dégrader le couplage dans le faisceau de fibres 3 ;
- faire propager du flux dans la gaine qui dégraderait la PSF en bout du faisceau de fibres 3 et de ce fait la résolution de l'appareillage.

5 A la différence de l'appareillage de la figure 1, le moyen d'injection 2 dans le faisceau de fibres 3 doit présenter ici une PSF égale au diamètre de cœur d'une fibre afin de pouvoir réaliser un couplage optimal avec une seule fibre.

10 Les lentilles L6-L7 et L10-L11 du système de balayage 32 sont deux doublets correcteurs identiques placés symétriquement par rapport au plan image. Ils permettent, avec le doublet L3 du système d'injection 2 d'obtenir une image de très bonne qualité en éliminant les aberrations résiduelles de la combinaison optique L5 , L8, L9, L12 et L4, et d'uniformiser le taux de couplage dans le faisceau de fibres 3 en supprimant la courbure de champ.

15 Elles permettent également de ce fait d'améliorer la résolution spatiale de l'appareillage en formant une tache dont la PSF est égale au diamètre de cœur des fibres, ce qui n'entraîne pas de propagation de lumière dans la gaine du faisceau de fibres 3 et donc une PSF en sortie dudit faisceau 3 identique à celle d'entrée.

20 L'appareillage comporte un système de filtrage spatial constitué d'une lentille L13 et d'un trou de filtrage 33 permettant de ne sélectionner que la fibre d'illumination et non les fibres adjacentes qui peuvent générer un signal parasite. La taille du trou de filtrage est telle qu'elle correspond au diamètre de cœur d'une fibre au grandissement près du système optique

25 entre l'entrée du faisceau de fibres 3 et le trou de filtrage 33.

 Le faisceau de fibres 3 est équipé à ces deux extrémités d'une lame de verre suffisamment épaisse et d'indice proche de celui des fibres afin de rejeter les réflexions parasites en dehors du trou de filtrage placé devant le détecteur pour la réflexion qui s'opère à l'entrée du faisceau de fibres 3, et

30 en dehors des fibres optiques illuminées pour la réflexion qui s'opère en

sortie du faisceau de fibres 3. Les lames de verre sont traitées anti-reflet afin de minimiser la lumière réfléchie.

Comme détecteur de signal 35 on utilise une photodiode à avalanche qui acquiert le signal en continu, ce qui nécessite de ramener le signal parasite provenant des deux extrémités du faisceau de fibres 3 au même ordre de grandeur que le signal utile afin de ne pas saturer le détecteur. La suppression du résidu de réflexion parasite à l'entrée du faisceau de fibres 3 est alors effectuée par un filtrage temporel numérique. Tout autre photodétecteur monopixel tel que le photomultiplicateur peut être utilisé, l'avantage de la photodiode à avalanche étant son rendement quantique de détection plus élevé que celui des autres détecteurs.

Afin de procéder au couplage des deux voies imagerie confocale/spectroscopie qui s'effectue avec deux sources de longueurs d'onde différentes, une lame dichroïque D2 réfléchissant le rouge et transmettant le bleu et le vert est utilisée. Le couplage pourrait aussi être réalisé en transmission dans le rouge et en réflexion dans le bleu et le vert, mais il présente des taux de réflexion et transmission moins optimales dans ce sens.

En fonctionnement, l'acquisition d'un spectre peut se faire simultanément à l'acquisition d'une image tomographique. L'appareillage comporte des moyens d'analyse et de traitement qui permettent à partir des signaux détectés par le détecteur de signal 35 de recréer une image numérique.

La résolution spatiale que l'on peut obtenir est de l'ordre de $5\mu\text{m}$. Elle permet notamment le diagnostic de lésions pré-cancéreuses basé sur la taille, la forme et la densité des noyaux observés.

Sur la figure 3, est représentée une variante de réalisation de l'appareillage de la figure 2. Les éléments identiques portent les mêmes références sur les deux figures. Selon cette variante, le couplage des deux voies imagerie confocale / spectroscopie est réalisé en amont des moyens de balayage 32. A cet effet, la lame dichroïque D2 est placée en amont du

miroir M1. L'avantage de cette construction est quelle permet d'utiliser les moyens de balayage 32 pour déplacer un faisceau d'excitation émis sur la voie spectroscopique possédant un diamètre utile plus petit que le diamètre total du faisceau de fibres 3, de manière à l'injecter en une position
5 différente sur la face d'entrée du faisceau 3. Cela permet par exemple de déplacer la zone d'analyse spectroscopique pour notamment la faire correspondre à une zone d'image obtenue par la voie de l'imagerie confocale.

En variante encore, pouvant s'appliquer aux appareillages des figures
10 1 à 3, on peut prévoir en remplacement de la lentille d'adaptation L1 un système afocal permettant de modifier la taille du faisceau d'excitation pour le faire correspondre à un sous-groupe donné de fibres optiques du faisceau 3.

Revendications

1. Appareillage d'analyse spectroscopique d'autofluorescence d'un tissu biologique comprenant une source d'excitation (1), un faisceau (3) constitué d'une fibre optique unique ou d'une pluralité de fibres optiques souples et un moyen d'injection (2) d'un signal d'excitation produit par ladite source dans ledit faisceau selon un diamètre utile correspondant à l'excitation de la fibre unique, de toutes les fibres optiques du faisceau ou d'un sous-groupe déterminé, et un moyen d'analyse (21,22) d'un signal d'autofluorescence émis, caractérisé en ce qu'il comporte en sortie du faisceau (3) une tête optique (4) destinée à être placée au contact du tissu biologique (6), ladite tête optique étant munie de moyens optiques adaptés à faire converger le signal d'excitation sortant dudit faisceau (3) en une zone d'analyse subsurfacique (5), la ou les mêmes fibres optiques ayant servi à véhiculer le signal d'excitation étant utilisées pour détecter le signal émis par ladite zone d'analyse subsurfacique, des moyens (D) placés en amont du moyen d'injection (2) étant en outre prévus pour séparer la longueur d'onde du signal d'excitation et la longueur d'onde du signal d'autofluorescence.

2. Appareillage selon la revendication 1, caractérisé en ce que les moyens optiques de la tête optique (4) comprennent un système de lentilles formant un objectif de focalisation adapté à transcrire la répartition spatiale de la tache focale (PSF) en sortie du faisceau de fibres et la qualité du front d'onde (WFE) et à minimiser la réflexion parasite s'opérant en sortie du faisceau de fibres.

3. Appareillage selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la tête optique (4) comprend une lame de verre destinée à venir en contact du tissu biologique à analyser et adaptée à réaliser une adaptation d'indice avec ledit tissu.

4. Appareillage selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comporte une lame de verre placée en

sortie du faisceau (3) de fibres optiques et commune avec la tête optique (4), ladite lame étant suffisamment épaisse pour rejeter les réflexions parallèles parasites en sortie dudit faisceau de fibres (3).

5 5. Appareillage selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le moyen d'injection (2) dans le faisceau (3) de fibres optiques présente une qualité de front d'onde et une répartition spatiale de l'intensité de la tache focale adaptée au diamètre utile du faisceau de fibres (3).

10 6. Appareillage selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la source d'excitation (1) émet à une longueur d'onde adaptée à exciter des fluorophores endogènes choisis présents dans les tissus biologiques du site observé.

15 7. Appareillage selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le moyen pour séparer les longueurs d'onde est une lame dichroïque (D).

8. Appareillage selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le moyen d'analyse spectroscopique comprend un spectrographe (20) et un moyen de couplage (21) à la fente du spectrographe.

20 9. Appareillage selon la revendication 8, caractérisé en ce que le moyen de couplage (21) à la fente du spectrographe comprend un moyen optique achromatique.

25 10. Appareillage selon la revendication 8 ou 9, caractérisé par un moyen de réjection (22) placé en amont du moyen de couplage (21) et adapté à supprimer la longueur d'onde d'excitation rétroémise.

11. Appareillage selon la revendication 10, caractérisé par une lentille (L2) placée en amont du moyen de réjection (22) adaptée à améliorer le rapport signal à bruit.

30 12. Appareillage selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comporte un moyen d'adaptation (L1)

de la taille du faisceau émis par la source d'excitation (1) au diamètre utile du faisceau de fibres optiques (3).

13. Appareillage selon l'une quelconque des revendications précédentes, le faisceau de fibres (3) comportant une pluralité de fibres optiques, caractérisé en ce qu'il comporte en outre des moyens pour réaliser conjointement une image confocale de la zone d'analyse (5), comprenant :

- une source d'illumination (30),
- un détecteur (35) du signal de retour pour analyse,
- 10 - un moyen de séparation (31) du signal d'illumination et dudit signal de retour,
- des moyens pour coupler (D2) le faisceau d'excitation pour l'analyse spectroscopique et le faisceau d'illumination pour l'imagerie confocale, avant l'entrée dans le moyen d'injection (2)
- 15 dans le faisceau de fibres optiques (3),
- un moyen (32) de balayage rapide des fibres une à une situé en amont du moyen d'injection dans le faisceau de fibres (3), et
- un système de filtrage (33) spatial à l'entrée du détecteur (35) de signal adapté à sélectionner le signal de retour provenant de la
- 20 fibre illuminée,

le moyen d'injection (2) dans le faisceau de fibres (3) présentant une répartition spatiale de l'intensité de la tache focale égale au diamètre de cœur d'une fibre, chaque fibre étant illuminée tour à tour et de manière adressée.

25 14. Appareillage selon la revendication 13, caractérisé en ce que les moyens de couplage sont placés en amont du moyen de balayage (32).

15. Appareillage selon la revendication 13 ou 14, caractérisé en ce que la source d'illumination (30) est une diode laser pulsée.

30 16. Appareillage selon l'une des revendications 13 à 15, caractérisé en ce que la source d'illumination présente une qualité de front d'onde de l'ordre de $\lambda/8$.

17. Appareillage selon l'une des revendications 13 à 16, caractérisé en ce que le détecteur (35) du signal de retour est une photodiode à avalanche.

5 18. Appareillage selon l'une quelconque des revendications 13 à 17, caractérisé en ce que les moyens de couplage (31) du signal d'excitation pour l'analyse spectroscopique et du signal d'illumination pour l'imagerie confocale, comprennent une lame dichroïque (D2).

10 19. Appareillage selon l'une quelconque des revendications 13 à 18, caractérisé en ce que le moyen (32) de balayage rapide des fibres une à une comprend un miroir résonant (M1) à une fréquence donnée et un miroir galvanométrique (M2) avec une fréquence variable, et deux systèmes optiques chacun constitué de lentilles (L5-8, L9-12) adaptées à conjuguer les deux miroirs (M1, M2) dans un premier temps puis le miroir galvanométrique (M2) et l'entrée du faisceau de fibres (3) dans un deuxième temps.

15 20. Appareillage selon l'une quelconque des revendications 13 à 19, caractérisé en ce que le système de filtrage spatial comprend un trou de filtrage (33) dont la taille est telle qu'elle correspond au diamètre de cœur d'une fibre au grandissement près du système optique entre l'entrée du faisceau de fibres (3) et le trou de filtrage (33).

1 / 3

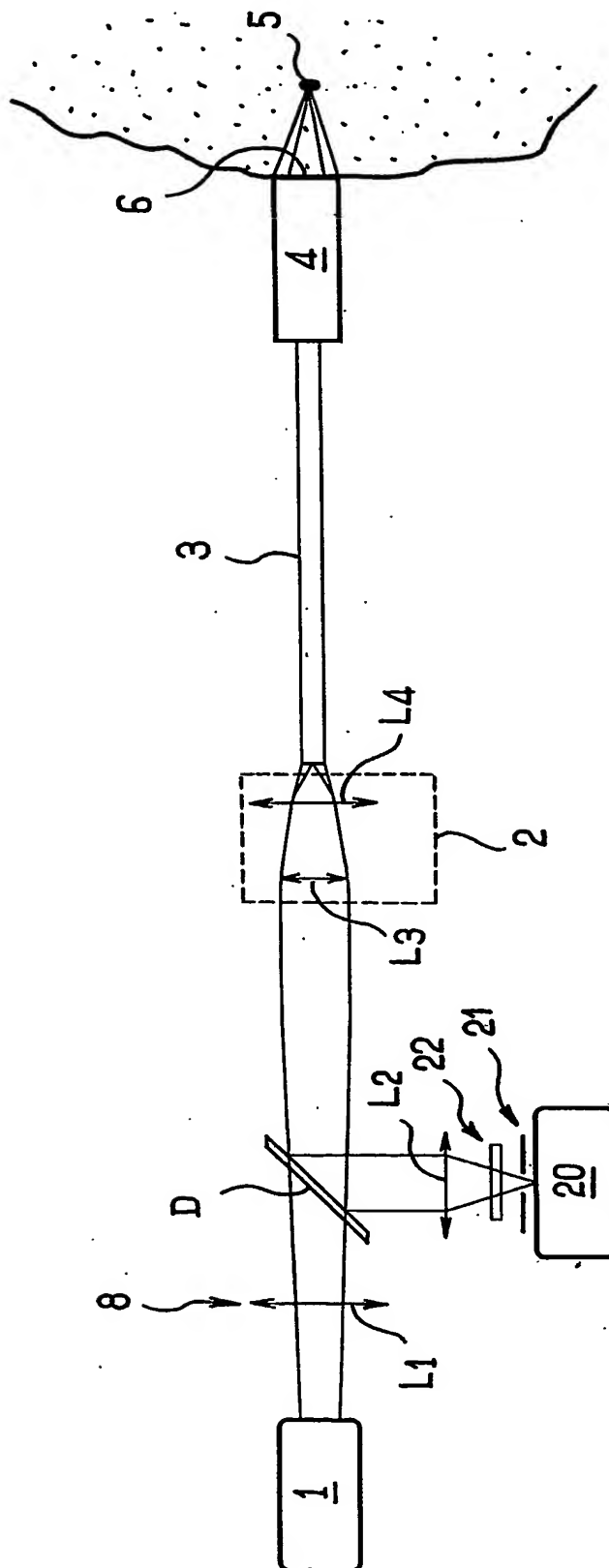


FIG. 1

2 / 3

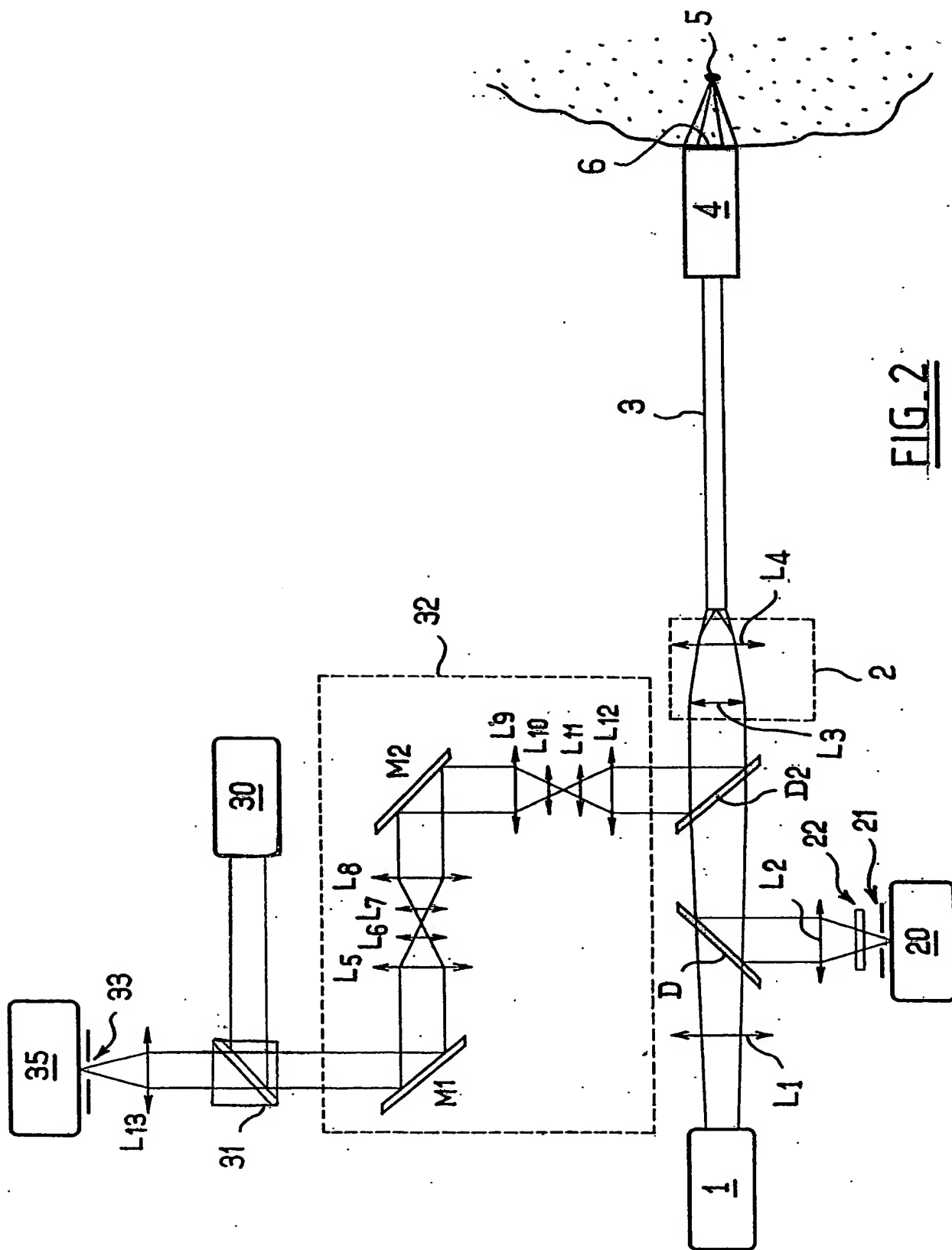
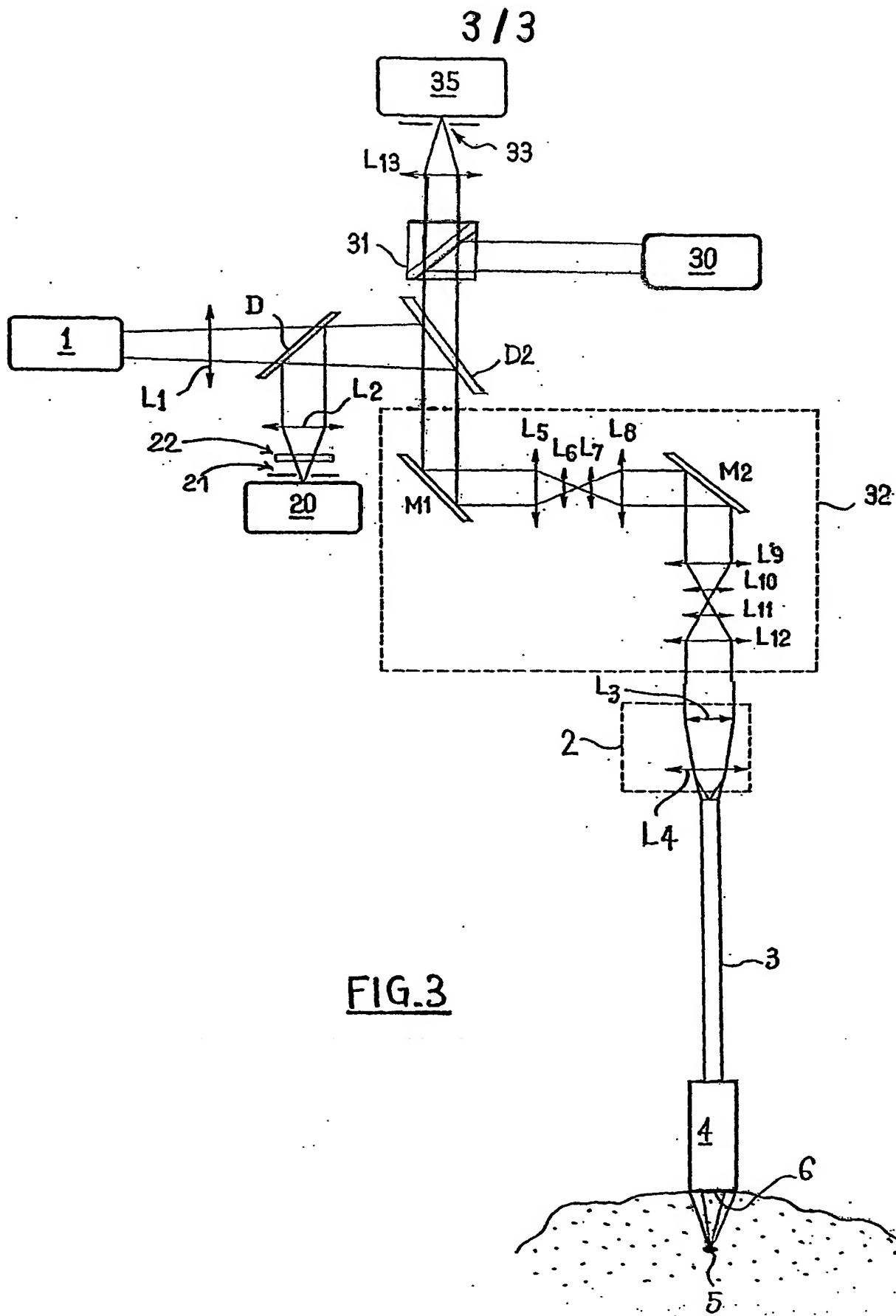


FIG. 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No

PCT/JP2/04480

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N21/64 A61B1/04 G02B23/26 A61B5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N A61B G02B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 16151 A (ASSIST PUBL HOPITAUX DE PARIS ; INST NAT SANTE RECH MED (FR); LAMAR) 23 March 2000 (2000-03-23) cited in the application	1,2, 5-15, 17-20
Y	page 5, line 20 - line 29 page 6, line 2 page 6, line 21 - line 24 page 9, line 24 - line 33 page 13, line 10 - line 29 page 14, line 17 - line 26 page 20, line 1 - line 3 page 20, line 24 - line 25 page 24, line 28 - line 30 ----- -/-	16

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 June 2003

Date of mailing of the international search report

11/06/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Navas Montero, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No

PCT/02/04480

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 47041 A (DESCOUR MICHAEL R ;RICHARDS KORTUM REBECCA R (US); BOWMAN BRETT S) 23 September 1999 (1999-09-23)	1-7,12
Y	page 18, line 23 -page 19, line 14	16
A	EP 1 157 655 A (FUJI PHOTO OPTICAL CO LTD) 28 November 2001 (2001-11-28) column 7, line 27 - line 29 column 8, line 45 - line 51	3,4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat

Application No

PCT/

02/04480

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0016151	A	23-03-2000	FR 2783330 A1	17-03-2000
			AT 228665 T	15-12-2002
			AU 5628399 A	03-04-2000
			BR 9913730 A	22-05-2001
			CA 2344165 A1	23-03-2000
			CN 1326557 T	12-12-2001
			DE 69904214 D1	09-01-2003
			DK 1114348 T3	24-03-2003
			EP 1114348 A1	11-07-2001
			WO 0016151 A1	23-03-2000
			JP 2002525133 T	13-08-2002
			US 6470124 B1	22-10-2002
WO 9947041	A	23-09-1999	AU 3102699 A	11-10-1999
			WO 9947041 A1	23-09-1999
			US 6370422 B1	09-04-2002
EP 1157655	A	28-11-2001	JP 2001327461 A	27-11-2001
			EP 1157655 A2	28-11-2001
			US 2001044571 A1	22-11-2001

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/02/04480

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 G01N21/64 A61B1/04 G02B23/26 A61B5/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 G01N A61B G02B

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 00 16151 A (ASSIST PUBL HOPITAUX DE PARIS ; INST NAT SANTE RECH MED (FR); LAMAR) 23 mars 2000 (2000-03-23) cité dans la demande	1,2, 5-15, 17-20
Y	page 5, ligne 20 - ligne 29 page 6, ligne 2 page 6, ligne 21 - ligne 24 page 9, ligne 24 - ligne 33 page 13, ligne 10 - ligne 29 page 14, ligne 17 - ligne 26 page 20, ligne 1 - ligne 3 page 20, ligne 24 - ligne 25 page 24, ligne 28 - ligne 30 ----- -/-	16

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

3 juin 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

11/06/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Navas Montero, E

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/92/04480

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 99 47041 A (DESCOUR MICHAEL R ; RICHARDS KORTUM REBECCA R (US); BOWMAN BRETT S) 23 septembre 1999 (1999-09-23)	1-7, 12
Y	page 18, ligne 23 - page 19, ligne 14	16
A	EP 1 157 655 A (FUJI PHOTO OPTICAL CO LTD) 28 novembre 2001 (2001-11-28) colonne 7, ligne 27 - ligne 29 colonne 8, ligne 45 - ligne 51	3, 4

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/02/04480

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication		Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0016151	A	23-03-2000	FR	2783330 A1	17-03-2000
			AT	228665 T	15-12-2002
			AU	5628399 A	03-04-2000
			BR	9913730 A	22-05-2001
			CA	2344165 A1	23-03-2000
			CN	1326557 T	12-12-2001
			DE	69904214 D1	09-01-2003
			DK	1114348 T3	24-03-2003
			EP	1114348 A1	11-07-2001
			WO	0016151 A1	23-03-2000
			JP	2002525133 T	13-08-2002
			US	6470124 B1	22-10-2002
WO 9947041	A	23-09-1999	AU	3102699 A	11-10-1999
			WO	9947041 A1	23-09-1999
			US	6370422 B1	09-04-2002
EP 1157655	A	28-11-2001	JP	2001327461 A	27-11-2001
			EP	1157655 A2	28-11-2001
			US	2001044571 A1	22-11-2001